

مقایسه سمیت سلولی میسل های تهیه شده از بتاسیکلودکسترین و دکستران بار شده با دوکسوروبیسین بر رده ی سلولی KG-1

مهنوش بنی طالبی^۱، ژاله ورشوساز^{۲*}، فرشید حسن زاده^۳، حجت صادقی علی آبادی^۴، محمد نایب الصدیان^۱

^۱دانشجو، گروه فارماسیوتکس، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۲گروه فارماسیوتکس، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛

^۳گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ ^۴گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۳

چکیده:

زمینه و هدف: آنتراسیکلین ها درمان اصلی لوسمی حاد میلوژنز می باشند، اما استفاده از آن ها به دلیل عوارض جانبی محدود شده است. استفاده از میسل های پلیمری برای دارورسانی هدفمند دوکسوروبیسین توسط گیرنده های فولات برای لوسمی حاد میلوژنز می تواند این عوارض را کاهش دهد. این مطالعه با هدف مقایسه سمیت سلولی میسل های تهیه شده از بتاسیکلودکسترین و دکستران حاوی دوکسوروبیسین بر رده ی سلولی KG-1 انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی، کونژوگه های رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید و رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید به روش استریفیکاسیون تهیه شدند. بارگیری دارو در میسل ها به روش انحلال مستقیم انجام شد. نانوذرات میسلی بهینه سازی شده براساس اندازه ذره ای، پتانسیل زتا، اندکس پلی دیسپرسیته، کارایی بارگیری و کارایی رهش دوکسوروبیسین انتخاب شدند. جهت مطالعه اثر ممانعت از رشد سلولی بر رده سلولی KG-1 از روش رنگ سنجی MTT استفاده شد.

یافته ها: دوکسوروبیسین بارگیری شده در نانو ذرات بهینه تهیه شده از کونژوگه ی رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید در غلظت $0.377 \mu\text{g/ml}$ ، دارای اثر ممانعت از رشد سلولی حدود $10/5$ برابر دوکسوروبیسین آزاد، 3 برابر دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین و $8/3$ برابر دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید بود ($P<0/05$). دوکسوروبیسین بارگیری شده در نانو ذرات بهینه تهیه شده از کونژوگه رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید در غلظت $0.377 \mu\text{g/ml}$ ، دارای اثر ممانعت از رشد سلولی حدود $1/3$ برابر دوکسوروبیسین آزاد و $1/2$ برابر دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های رتینوئیک اسید/ دکستران بود ($P<0/05$).

نتیجه گیری: نانو ذرات تهیه شده از سیکلودکسترین حاوی دوکسوروبیسین اثربخشی بیشتری علیه سلول های سرطانی KG-1 نسبت به نانو ذرات تهیه شده از دکستران حاوی دوکسوروبیسین و داروی آزاد دارد.

واژه های کلیدی: دکستران، سیکلودکسترین، رتینوئیک اسید، فولیک اسید، دوکسوروبیسین، نانو ذرات میسلی.

مقدمه:

افراد زیر ۶۵ سال و ۱/۶۲٪ در بیماران مسن تر از ۶۵ سال است. بیماران مبتلا به AML بیشتر اوقات با علائم غیر اختصاصی مراجعه می کنند. این علائم که به تدریج یا ناگهان شروع می شوند در نتیجه ی کم خونی، لکوسیتوز یا لکوپنی هستند. تقریباً نیمی از بیماران قبل از تشخیص لوسمی، علائم فوق را برای مدت ۳ ماه یا بیشتر داشته اند (۲).

لوسمی حاد میلوژنز (Acute myeloid leukemia=AML) بیماری است که در آن تمایز سلول های بنیادی همتوپوئیتیک مختل می شود (۱). میزان بروز سالانه ی لوسمی حاد میلوژنز تقریباً $0.36/100,000$ است و میزان بروز در گروه های سنی مشابه در مردان نسبت به زنان بیشتر است ($0.42/100,000$ در مقابل $0.3/100,000$). میزان بروز AML با بالا رفتن سن افزایش می یابد، این میزان معادل $0.17/100,000$ در

درمان اصلی این بیماری آنتی بیوتیک های آنتراسیکلینی مانند دوکسوروبیسین هستند که تقریباً باعث بهبود ۷۰ درصدی و افزایش ۴۰-۳۰ درصدی طول عمر در بیماران مبتلا به AML می شوند. علیرغم موفقیت دوکسوروبیسین در درمان AML، عوارض شدید آن مانند سرکوب مغز استخوان و سمیت قلبی که عمدتاً به صورت مزمن و به شکل نارسایی احتقانی قلب بروز می کند، استفاده از آن را محدود کرده است (۴،۳). به منظور کاهش عوارض جانبی داروهای ضد سرطان، سیستم های حامل مختلفی در ابعاد نانومتر مانند نانو ذرات جامد، لیپوزوم ها، دندریمرها، تجمععات پروتئینی و میسل ها تکامل یافته اند. عقیده بر این است که این سیستم ها باعث کاهش سمیت در اندام های طبیعی، افزایش زمان در گردش بودن دارو، کاهش سرعت متابولیسم دارو و تسهیل دارو رسانی به محل تومور می شوند (۵).

در طی دهه ی گذشته، میسل های پلیمری به عنوان سیستم های دارو رسانی توجه روز افزون دانشمندان را به خود جلب کرده اند. در محیط آبی کopolymerهای دی-بلاک آمفی فیل قادرند خود به خود به هم پیوندند و میسل های پلیمری را تشکیل دهند. میسل ها دارای یک ساختار هسته-پوسته هستند، هسته ی داخلی آبرگریز مولکول های دارو را انکپسوله می کند و پوسته ی خارجی آبدوست در تماس با محیط آبی قرار گرفته و از شناسایی میسل پلیمری توسط سیستم رتیکولاتدوتلیال در داخل بدن جلوگیری می کند (۶،۷). از دیگر مزایای میسل ها، پایداری ترمودینامیک بالا در شرایط فیزیولوژیک، ابعاد کوچک در حد نانومتر، سمیت پایین و قابلیت فرسایش بیولوژیک می باشد (۸،۹). در مطالعات متعددی میسل های پلیمری به عنوان حامل داروهای ضد سرطان مورد بررسی قرار گرفته اند (۱۰).

پوسته ی خارجی میسل ها باید غیر سمی و آبدوست باشد و بتواند زیست دستیابی داروی بارگیری شده را افزایش دهد (۱۱). برای این منظور در این مطالعه

از بتا سیکلودکسترین و دکستران ۱۰۰۰۰ استفاده شده است. بتا سیکلودکسترین یک الیگوساکارید حلقوی حاوی ۷ واحد گلوکوپیرانوز است که دارای سمیت پایین، هیدروفیلیته ی بالا، سازگاری بیولوژیک و قابلیت فرسایش بیولوژیک عالی می باشد (۱۲،۱۳). یکی از کاربردهای قابل توجه بتاسیکلودکسترین کاربرد آن در سیستم های کنترل رهش به عنوان حامل دارویی می باشد (۱۴-۱۲). یکی از پلیمرهایی که اخیراً از این الیگوساکارید تهیه شده است کوپلیمر بتاسیکلودکسترین/ پلی (۲-بنزیل L-گلوتامات) می باشد (۱۵).

دکستران ها پلیمرهای گلوکزی هستند که بیش از ۵۰ سال است برای افزایش حجم پلاسما، بهبود جریان گردش خون محیطی و به عنوان عوامل ضد ترومبوز بکار رفته اند. اخیراً از دکستران ها به عنوان حامل های ماکرومولکولی قوی و پر قدرتی برای دارو رسانی داروها و پروتئین ها استفاده شده است. از نظر ساختمانی دکستران ها توسط اتصال خطی ۱-۶، α -1, 3 گلوکوزیدی با شاخه ای محدود از طریق اتصال ۱ و ۳ ساخته می شوند (۱۶،۱۷). از انواع میسل های تهیه شده با دکستران می توان به کوپلیمر دکستران/ کاپرولاکتون اشاره کرد که جهت رهش کنترل شده پکلی تاکسل و دوکسوروبیسین به کار رفته است (۱۸،۱۹).

برای القای خاصیت آمفی فلیک به منظور تشکیل میسل، باید یک ماده هیدروفوب به کمک واکنش شیمیایی به سیکلودکسترین یا دکستران متصل شود. در این مطالعه رتینوئیک اسید، به دلیل ویژگی های مناسب مانند: دارا بودن خاصیت ضد سرطانی در برابر بسیاری از سرطان ها مانند لوسمی حاد میلوژنز، توانایی کنترل تقسیم، تمایز و آپوپتوز سلول ها، حلالیت بسیار کم در آب به دلیل زنجیره کربنی بلند آن و دارا بودن گروه کربوکسیلیک اسید برای واکنش دادن با گروه هیدروکسیل دکستران یا سیکلودکسترین و تشکیل استر، به عنوان قسمت هیدروفوب پلیمر انتخاب شد. رتینوئیک اسید فعال ترین واسطه بیولوژیک در مسیر متابولیکی ویتامین A (رتینول) می باشد (۲۰) و

همچنین قادر به افزایش بیان گیرنده های نوع بتا (B) فولات بر سطح سلول های KG-1 می باشد (۳،۴) که این مسئله یکی از دلایل مهم انتخاب آن است.

وصل کردن نانو ذره به لیگاندی که نانو ذره را به سمت رستپورهای که به مقدار زیاد در سطح سلول های سرطانی بیان شده، هدایت کند استراتژی می باشد که می تواند سهولت و انتخابی بودن دسترسی نانو ذره را به داخل سلول بهتر کند (۲۱).

فولیک اسید یکی از لیگاندهای هدفمند کننده می باشد که بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است و به دلایل زیر به یک ابزار پرکاربرد جهت دارو درمانی هدفمند تبدیل شده است:

۱- به میزان زیادی توسط سلول های با تکثیر سلولی بالا مصرف می شود؛ ۲- تمایل زیادی به اتصال به گیرنده دارد ($k_d \approx 10^{-10} M$)؛ ۳- عدم تحریک ایمنی؛ ۴- اندازه کوچک (وزن مولکولی ۴۴۱/۴ گرم بر مول)؛ ۵- پایداری بالا؛ ۶- سازگاری با بسیاری از حلال های آلی و آبی؛ ۷- در بسیاری از سرطان های انسان مانند سرطان تخمدان، مغز، کلیه، سینه، سلول های میلوئید و ریه افزایش بیان رستپور فولات اتفاق می افتد (۲۲).

رستپور فولات دارای سه ایزوفر α ، β و γ می باشد. در تومورهای انسانی، رستپورهای نوع α و β به میزان زیادی دچار افزایش بیان می شوند. تحقیقات نشان داده است که غشاهای دارای رستپور فولات نوع β در طحال بیماران دارای لوکمای مزمن میلوئیدی (CML) و لوکمای حاد میلوئیدی (AML) افزایش می یابد (۲۳). در بافت های طبیعی بیان رستپور فولات نوع β محدود به جفت و سلول های هماتوپوئیک، هنگام بلوغ نوتروفیل ها و فعال سازی مونوسیت/ ماکروفاژ، می باشد. بر خلاف سلول های AML، رستپورهای نوع β در این بافت های طبیعی قادر به اتصال به فولیک اسید نمی باشند (۳،۲۴). Park و همکارانش فولات را به کوپلیمر آمفی فیل متوکسی پلی (اتیلن گلیکول)/ پلی (ε-کاپرولاکتون) متصل کردند و

از این میسل های پلیمری هدفمند برای دارو رسانی پکلی تاکسل به رده های سلولی MCF-7 و Hela استفاده کردند و گزارش دادند میسل های هدفمند حاوی پکلی تاکسل اثر ممانعت از رشد سلولی بیشتری نسبت به میسل های غیر هدفمند حاوی پکلی تاکسل بر این رده های سلولی داشتند (۲۲). در این مطالعه نیز از فولیک اسید به عنوان عامل هدفمند کننده استفاده شده است.

هدف از مطالعه ی حاضر، مقایسه ی اثر ممانعت از رشد سلولی دو نوع میسل هدفمند و غیر هدفمند رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین با میسل های هدفمند و غیر هدفمند رتینوئیک اسید/ دکستران بود. با توجه به اینکه رستپور های فولات در رده ی سلولی KG-1 از لوسمی حاد میلوژنز افزایش بیان پیدا می کنند، میسل های فوق با استفاده از لیگاند فولیک اسید هدفمند شده اند.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی کوژوگه های رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید و رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید به روش استریفیکاسون تهیه شدند. جهت تهیه ی کوژوگه ی رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین، ۳۰۰ میلی گرم رتینوئیک اسید (Solmag، ایتالیا) همراه با کربونیل دی ایمیدازول (CDI) (Sigma، آمریکا) به میزان ۱/۵ برابر مولی رتینوئیک اسید در ۱۰ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) خشک حل شد. محلول به دست آمده در تاریکی و در دمای ۶۰ درجه ی سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت به هم زده شد، سپس این محلول به محلول ۵۶۷/۵ میلی گرم سیکلودکسترین (Sigma، آمریکا) و دی متیل آمینوپیریدین (DMAP) (Merck، آلمان) به میزان ۱/۱ برابر مولی رتینوئیک اسید در ۱۰ میلی لیتر DMSO خشک اضافه شد. محلول به دست آمده تحت اتمسفر نیتروژن در تاریکی و دمای ۶۰ درجه ی سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت به هم زده شد.

شد. با استفاده از معادله ی جذب - غلظت در محیط آب مقطر، غلظت نمونه ها و در نهایت مقدار داروی بارگیری نشده محاسبه شد که با کسر این مقدار از مقدار داروی اولیه ی به کار رفته در تهیه ی میسل ها، میزان کارایی بارگیری شده در میسل ها به دست آورده شد. کارایی بارگیری دارو در میسل ها از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۶):

$$\text{میزان داروی بارگیری شده} = \frac{\text{کارایی بارگیری}}{\text{وزن داروی به کار رفته}} \times 100$$

برای اندازه گیری سرعت رهش دارو از میسل ها، مقدار ۶ میلی لیتر از محلول میسلی در کیسه ی دیالیز (Sigma، آمریکا) با نقطه ی برش (cut off) وزن مولکولی ۱۲۰۰۰ دالتون ریخته شد. پس از بستن دو سر کیسه درون ۱۵ میلی لیتر بافر فسفات (pH=۷/۴) حاوی ۲ درصد توین ۲۰، روی استیر با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه و دمای اتاق قرار داده شد (۲۶).

در زمان های مشخص از محیط رهش نمونه گیری شد و جذب آن در برابر بلانک (که تمامی مراحل گفته شده برای آن نیز انجام شده بود) در طول موج ۴۹۹/۴ نانومتر خوانده شد و نمودار رهش در برابر زمان رسم شد.

برای بررسی اثر ممانعت از رشد یا تکثیر سلولی از روش MTT (3-[4, 5-dimethylthiazolyl-2]-2, 5-) diphenyl tetrazolium bromide استفاده شد (۲۷). این آزمایش ها بر روی رده سلولی KG-1 (انستیتو پاستور، ایران) انجام شد. سلول های KG-1 مربوط به لوسمی حاد میلوئید می باشند و به صورت سوسپانسیون رشد می کنند. محیط کشت مورد استفاده برای سلول های KG-1 محیط کشت RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) (FBS) Fetal Bovin Serum درصد ۱۰ حاوی ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین است. این سوسپانسیون سلولی در انکوباتور در دمای ۳۷ و ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد رشد می کنند.

محصول واکنش با افزودن اتیل استات به میزان ۵ برابر حجم DMSO استخراج شد، ۳ مرتبه با اتیل استات شسته و در آن خلاء با دمای ۴۰ درجه ی سانتیگراد خشک شد.

اتصال فولیک اسید (Merck، آلمان) به کونژوگه ی رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین مطابق با روش توضیح داده شده در بالا انجام شد. مقدار فولیک اسید ۴۴۱ میلی گرم، بقیه ی شرایط واکنش و همچنین استخراج کونژوگه بتاسیکلودکسترین/ رتینوئیک اسید هدفمند شده با فولیک اسید همانند مرحله ی اول انجام شد.

بارگیری دوکسوروبیسین (Hangzhou ICH Biopharm) (چین) در میسل ها به روش انحلال مستقیم انجام شد. برای این منظور ۲۰ میلی گرم از کونژوگه سنتز شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل شد، ۳ میلی گرم دوکسوروبیسین (۱۵ درصد وزن کونژوگه) به این محلول اضافه و حل شد، سپس این محلول برای مدت زمان یک ساعت، با سرعت ۵۶۰ دور در دقیقه و دمای ۴۰/۷ درجه ی سانتیگراد در تاریکی روی هیتز استیرر در حال بهم زدن قرار گرفت، سپس این محلول به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه پروب سونیکیتور (Bandeline HD3200، آلمان) سونیکه شد (۲۵).

پس از تهیه ی نانو ذرات میسلی؛ اندازه ی ذره ای، پتانسیل زتا و اندکس پلی دیسپرسیستی توسط دستگاه نانو-زتا سائزر مالورن (Malvern Nano ZS ZEN 3600، انگلیس) اندازه گیری شد.

جهت اندازه گیری میزان دوکسوروبیسین بارگیری شده در نانو ذرات، ۴۰۰ میکرولیتر از محلول میسلی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Hettich EBA20، آلمان) گردید. برای نمونه ی بلانک (نمونه ی حاوی میسل بدون دارو) نیز این مراحل انجام شد. جذب محلول ها در طول موج ۲۴۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفومتر ماوراء بنفش (Shimadzu UV-min1240، ژاپن) اندازه گیری شد. مقدار جذب به دست آمده ی نمونه ی بلانک از مقدار جذب نمونه ی حاوی دارو کم

به کمک دستگاه (Statfax 2100) ELISA Reader (آمریکا) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. همه ی این مراحل سه بار تکرار شد.

درصد سلول های زنده با استفاده از معادله ی

زیر برای هر ردیف محاسبه شد:

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{\text{میانگین بلانک} - \text{میانگین هر ردیف}}{\text{میانگین بلانک} - \text{میانگین کنترل منفی}} \times 100$$

برای بررسی آماری نتایج به دست آمده از این مطالعه از نرم افزار SPSS17 استفاده شد. نتایج به دست آمده از آزمایش ها، توسط آزمون آماری آنالیز واریانس یک راهه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و جهت پی بردن به محل اختلاف گروه ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که در صورتی که $P < 0.05$ باشد، اختلاف میانگین ها معنی دار تلقی می شود.

یافته ها:

هر دو نوع پلیمر میسل هایی با اندازه ی ذره ای مناسب تولید کردند (کمتر از ۲۰۰ نانومتر). پایین بودن اندکس پلی دیسپرسیته این ذرات (۰/۲۷۸ و ۰/۳۵۴) به معنی یکنواختی خوبی در توزیع اندازه ی آن هاست. قدر مطلق پتانسیل زتا در میسل های تهیه شده از پلیمر رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید (۳۶- میلی ولت) بیشتر از میسل های رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید (۴/۶۸- میلی ولت) بود که نشان دهنده ی پایداری بیشترشان است. زمان لازم برای آزاد شدن ۵۰٪ داروی بارگیری شده در میسل های رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید حدود ۴ ساعت و برای میسل های رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید حدود ۰/۵ ساعت بود (جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱).

ابتدا سوسپانسیون سلولی (رده ی سلولی KG-1)

با غلظت 5×10^4 سلول در هر میلی لیتر تهیه شد و در هریک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ۱۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی ریخته شد و سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتیگراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شد. یک ردیف به عنوان بلانک سلولی، تنها با محیط کشت پر شد. در هر یک از چاهک های پلیت ۱۸۰ میکرولیتر مدیا، ۱۰ درصد FBS و 9×10^3 سلول وجود دارد.

پس از تهیه ی میسل ها، به هر ردیف از چاهک های پلیت موارد زیر اضافه شد:

۲۰ میکرولیتر از میسل های هدفمند و غیر هدفمند که حاوی غلظت های ۱/۸۹ و ۳/۷۷ میکروگرم در میلی لیتر از دوکسوروبیسین خالص بودند. برای رسیدن به غلظت های ۰/۱۸۹ و ۰/۳۷۷ میکروگرم در میلی لیتر داروی خالص، ۲۰ میکرولیتر از میسل های هدفمند و غیر هدفمند فاقد دارو به عنوان بلانک میسل های حاوی دارو و ۲۰ میکرولیتر از دوکسوروبیسین خالص در همان غلظت ها به عنوان شاهد مثبت و به یک ردیف سلول که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بود چیزی اضافه نشد.

پلیت به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از این زمان پلیت به مدت ۵ دقیقه در ۱۸۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد و به تمام چاهک ها ۲۰ میکرولیتر MTT (Merck، آلمان) اضافه شد و سلول ها به مدت سه ساعت درون انکوباتور قرار داده شد، سپس پلیت مجدداً به مدت ۵ دقیقه در ۱۸۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد، به رسوب حاصل مقدار ۱۸۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و هر ردیف پیتاژ شد. در نهایت جذب چاهک ها

نوع میسل	اندازه ی ذره ای	اندکس پلی	پتانسیل زتا	کارآیی بارگیری	زمان آزاد سازی ۵۰٪
	(nm)	دیسپرسیته	(mv)	(%)	داروی بارگیری شده (h)
رتینوئیک اسید / سیکلودکسترین / فولیک اسید	۱۰۳/۸۶±۴/۶۹	۰/۲۷۸±۰/۰۵	- ۳۶	۱۰۰	۴
رتینوئیک اسید / دکستران / فولیک اسید	۸۲/۸۶±۱/۰۴	۰/۳۵۴±۰/۰۱	- ۴/۶۸	۹۶/۳۳±۳/۳۱	۰/۵

درصد سلول‌های زنده

غلظت ($\mu\text{g/ml}$)

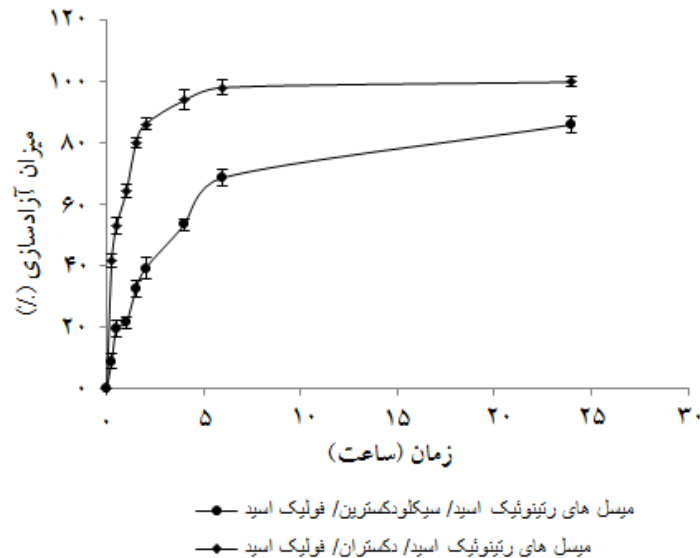
۰/۱۸۹ ۰/۳۷۷

■ دوکسوروبیسین هیدروکربنوکس
 ■ بلاتنگ میسل های ریتینوئیک اسید/سیکلودکسترین
 ■ میسل های ریتینوئیک اسید/سیکلودکسترین حاوی دوکسوروبیسین
 ■ بلاتنگ میسل های ریتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید
 ■ میسل های ریتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید حاوی دوکسوروبیسین
 ■ بلاتنگ میسل های ریتینوئیک اسید/دکستران
 ■ میسل های ریتینوئیک اسید/دکستران حاوی دوکسوروبیسین
 ■ بلاتنگ میسل های ریتینوئیک اسید/دکستران/فولیک اسید
 ■ میسل های ریتینوئیک اسید/دکستران/فولیک اسید حاوی دوکسوروبیسین

و دکستران بر روی رده ی سلول های سرطانی، KG-1

میسل های رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید حاوی دوکسوروبین می باشد (P<۰/۰۵). اثر ممانعت از رشد سلولی میسل های رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید حاوی دوکسوروبین در این غلظت ۱/۳ برابر دوکسوروبین آزاد و ۱/۲ برابر میسل های رتینوئیک اسید/ دکستران حاوی دوکسوروبین می باشد (P<۰/۰۵). در

غلظت های ۰/۱۸۹ و ۰/۳۷۷ میکروگرم در میلی لیتر بین اثر ممانعت از رشد سلولی دوکسوروبیسین آزاد و میسل های رتینوئیک اسید/ دکستران حاوی دوکسوروبیسین اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P > 0/05$) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱: مقایسه سرعت آزادسازی دارو میسل های تهیه شده از بتاسیکلودکسترین و دکستران
 $n=3$ و داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار می باشند.

بحث:

رتینوئیک اسید و سیکلودکسترین یا دکستران استفاده شد. همچنین جهت رساندن اختصاصی دارو به سلول های سرطانی خون از اتصال فولیک اسید به سطح نانو ذرات استفاده شده است. اجزاء تشکیل دهنده ی کopolymerهای رتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید و رتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید توسط واکنش استریفیکاسیون به هم متصل شدند و به منظور ساخت نانو ذرات میسلی و بارگیری دارو در آن ها از روش انحلال مستقیم استفاده شد.

همانگونه که نتایج نشان می دهد هر دو نوع پلیمر میسل هایی با اندازه ی ذره ای مناسب تولید کرده اند. اندازه ی کوچک میسل های پلیمری (کمتر از ۲۰۰ نانومتر) این اجازه را به آن ها می دهد تا از مکانیسم

دوکسوروبیسین یکی از مؤثرترین آنتی بیوتیک های ضد سرطان است که در طیف گسترده ای از سرطان ها استفاده می شود. علیرغم موفقیت دوکسوروبیسین در درمان، عوارض و سمیت بالای آن مصرف این دارو را محدود کرده است. درمان طولانی مدت با دوکسوروبیسین عوارض شدیدی مانند سرکوب مغز استخوان و سمیت قلبی دارد که کاردیومیوپاتی غیر قابل بازگشت ناشی از آن می تواند منجر به نارسایی احتقانی قلب شود (۵،۲۸،۲۹،۴).

میسل های پلیمری به منظور کاهش سمیت و بهبود اثربخشی درمانی داروهای ضد سرطان طراحی شده اند. در این مطالعه برای تهیه ی این میسل ها از

های غربالگری بدن عبور کنند (۳۰) و قدرت نفوذ و ماندگاری در محل تومور افزایش می یابد (۳۱،۳۲).

پایین بودن اندکس پلی دیسپرسیته این ذرات (۰/۲۷۸ و ۰/۳۵۴) به معنی یکنواختی خوبی در توزیع اندازه ی آن هاست. ذرات شارژ دار با قدر مطلق پتانسیل زتای بالاتر، با دفع الکتریکی ذرات باعث کاهش تجمع ذرات و بنابراین پایداری بیشتر دیسپرسیون می شوند (۳۳). همانطور که مشخص است قدر مطلق پتانسیل زتا در میسل های تهیه شده از پلیمر رتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید (۳۶- میلی ولت) بیشتر از میسل های رتینوئیک اسید/دکستران/فولیک اسید (۴/۶۸- میلی ولت) است که نشان دهنده ی پایداری بیشترشان است. کارآیی بارگیری دارو در میسل های تهیه شده از هر دو نوع پلیمر بالا می باشد. زمان لازم برای آزاد شدن ۵۰٪ داروی بارگیری شده در میسل های رتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید حدود ۴ ساعت و برای میسل های رتینوئیک اسید/دکستران/فولیک اسید حدود ۰/۵ ساعت می باشد که نشان دهنده ی رهش آهسته تر دارو از میسل های رتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید است و می تواند باعث رهش تدریجی دارو در محل مورد نظر در بدن شود.

بر اساس نتایج، داروی بارگیری شده در هر دو نوع میسل هدفمند رتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید و رتینوئیک اسید/دکستران/فولیک اسید اثر ممانعت از رشد سلولی بیشتری نسبت به داروی خالص نشان داده اند و همچنین اثر ممانعت از رشد سلولی در مورد داروی بارگیری شده در میسل های هدفمند بیشتر از داروی بارگیری شده در میسل های غیر هدفمند می باشد که علت این موضوع می تواند موفقیت احتمالی در وارد کردن دارو به صورت فعال با مکانیسم اندوسیتوز به واسطه ی رسپتور فولات باشد. البته اثبات این مسئله نیازمند مقایسه ی این داده ها با داده های حاصل از مطالعه بر روی سلول های فاقد رسپتور فولات می باشد که پیشنهاد می شود این بررسی در مطالعات آتی انجام شود.

همچنین اثر ممانعت از رشد سلولی در مورد دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های رتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید بیشتر از دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های رتینوئیک اسید/دکستران/فولیک اسید می باشد. این مسئله می تواند به دلیل رهش آهسته تر دارو از میسل های رتینوئیک اسید/سیکلودکسترین/فولیک اسید باشد که باعث می شود دارو فرصت بیشتری برای ورود به داخل سلول به واسطه ی رسپتور فولات داشته باشد. نتایج مطالعات گذشته نیز مشابه نتایج به دست آمده در این پژوهش می باشد.

در مطالعه ای دوکسوروبیسین در میسل های کیتوزان-آلبومین هدفمند شده با رتینوئیک اسید بارگیری شده و گزارش شد که در رده ی سلولی HepG2، دوکسوروبیسین بارگیری شده در این میسل های هدفمند اثر ممانعت از رشد سلولی ۲ برابر دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های غیر هدفمند و ۳ برابر دوکسوروبیسین آزاد نشان داده است (۳۴). Lee و همکاران لیپوزوم های پگیده شده را با فولات هدفمند کرده و دوکسوروبیسین را در آن ها بارگیری نموده و گزارش داده اند که اثر ممانعت از رشد سلولی لیپوزوم های هدفمند روی سلول های KB، ۸۶ برابر لیپوزوم های غیر هدفمند و ۲/۷ برابر داروی آزاد بوده است (۳۵). در مطالعه ی دیگری You و همکاران پکلی تاکسل را در میسل های پلیمری از کیتوزان-استتاریک اسید کونژوگه شده با فولات بارگیری کرده و مشاهده کردند که اثر ممانعت از رشد سلولی روی سلول های Hela در مقایسه با داروی آزاد به میزان قابل توجهی افزایش یافته است که این مسئله احتمالاً به دلیل افزایش ورود دارو به داخل سلول با واسطه ی فولات می باشد (۳۶). Hayama و همکاران کامپوتوسین را در میسل های هدفمند شده با فولات بارگیری کردند و گزارش داده اند که بر رده سلولی KB که گیرنده های فولات را بیش از حد بیان می کند، داروی بارگیری شده در میسل های هدفمند جذب

نتیجه گیری:

نانو ذرات میسل ریتینوئیک اسید/ سیکلودکسترین/ فولیک اسید حاوی دوکسوروبیسین و ریتینوئیک اسید/ دکستران/ فولیک اسید حاوی دوکسوروبیسین که برای گیرنده های فولیک اسید هدفمند شده اند می توانند باعث افزایش اثرات سایتوتوکسیک این دارو در رده ی سلولی KG-1 که این گیرنده ها را به میزان زیادی بیان می کند، شوند. این مسئله تأیید کننده این مدعاست که هدفمند کردن داروی سایتوتوکسیک به یک رده سلولی خاص باعث افزایش نفوذ دارو و در نتیجه افزایش سمیت آن خواهد بود. با توجه به این نتایج، این سیستم های حامل دارویی ممکن است بتوانند برای کاهش دوز مورد مصرف دوکسوروبیسین و همچنین کاهش عوارض سیستمیک آن به ویژه سمیت قلبی ارزشمند باشند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش قسمتی از پایان نامه مهنوش بنی طالبی می باشد و با حمایت مالی دانشکده ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است که بدین وسیله محققین مراتب تشکر و سپاس خود را اعلام می دارند.

سلولی و سمیت بیشتری نسبت به داروی بارگیری شده در میسل های غیر هدفمند دارد (۳۷).

با توجه به بهبود اثربخشی دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های هدفمند تولید شده در این پژوهش نسبت به دوکسوروبیسین خالص در رده ی سلولی KG-1، پیشنهاد می شود مطالعات آتی در این زمینه انجام شود مانند:

۱- انجام مطالعه ی بررسی اثر درمانی دوکسوروبیسین بارگیری شده در میسل های هدفمند به شکل فرآورده تزریقی در مقایسه با داروی آزاد در موش های Nude که لوسمی حاد میلوژنز در آن ها القا شده است.

۲- بررسی توزیع بافتی این میسل های هدفمند به شکل فرآورده ی تزریقی در درون تن جهت کاهش سمیت قلبی دوکسوروبیسین.

۳- بارگیری دیگر داروهای ضد سرطان در این میسل های هدفمند و انجام تست های بارگیری، آزادسازی و سمیت سلولی جهت بررسی امکان قابلیت بارگیری داروهای با لیپوفیلیسیته متفاوت.

منابع:

1. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia . Exp Hematol. 2009; 37 (6): 469-58.
2. Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. New York: Mcgrow Hill; 2001: 706-714.
3. Li H, Lu Y, Piao L, Wu J, Liu S, Marcucci G, et al. Targeting human clonogenic acute myelogenous leukemia cells via folate conjugated liposomes combined with receptor modulation by all-trans retinoic acid. Int J Pharm. 2010; 402(1-2): 57-63.
4. Pan XQ, Zheng X, Shi G, Wang H, Ratnam M, Lee RJ. Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor beta-targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid. Blood. 2002; 100(2): 594-602.
5. Xiao K, Luo J, Li Y, Lee JS, Fung G, Lam KS. PEG-oligocholeic acid telodendrimer micelles for the targeted delivery of doxorubicin to B-cell lymphoma. J Control Release. 2011; 155(2): 272-81.
6. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. Nanomedicine. 2010; 6(6): 714-29.

7. Yoo HS, Park TG. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *J Control Release*. 2004; 96(2): 273-83.
8. Jones MC, Leroux JC. Polymeric micelles-a new generation of colloidal drug carriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 1999; 48 (2): 101-111.
9. Tian HY, Deng C, Lin H, Sun J, Deng M, Chen X, et al. Biodegradable cationic PEG-PEI-PBLG hyperbranched block copolymer: synthesis and micelle characterization. *Biomaterials*. 2005; 26(20):4209-17.
10. Wei Z, Hao J, Yuan S, Li Y, Juan W, Sha X, Fang X. Paclitaxelloaded pluronic P123/P127 mixed polymeric micelles: Formulation, Optimization and in vitro characterization. *Int J Pharm*. 2009; 376 (1-2): 176-185.
11. Francis MF, Lavoie L, Winnik FM, Leroux JC. Solubilization of cyclosporin A in dextran-g-polyethyleneglycolalkyl ether polymeric micelles. *Eu J Pharm Biopharm*. 2003; 56 (3): 337-349.
12. Prabakaran M, Mano JF. Chitosan derivatives bearing cyclodextrin cavities as novel adsorbent matrices. *Carbohydr Polym*. 2006; 63 (2): 153-66.
13. Lu D, Yang L, Zhou T, Lei Z. Synthesis, characterization and properties of biodegradable polylactic acid- β -cyclodextrin cross-linked copolymer microgels. *Euro Polym J*. 2008; 44 (7); 2140-2145.
14. Hedges AR. Industrial applications of Cyclodextrins. *Chem Rev*. 1998; 98(5): 2035-44.
15. Jiang J, Zhang L, Wu M, Zhang X. Synthesis and characterization of a novel biodegradable amphiphilic MPEG-dendritic block copolymer containing (glycolic acid)-alt-(lactic acid) oligomer and glycerol. *J Control Release*. 2011; 152 Suppl 1: e264-6.
16. Mehvar R. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Release*. 2000; 69(1): 1-25.
17. Dhaneshwar SS, Kandpal M, Gairola N, Kadam SS. Dextran: A promising macromolecular drug carrier. *Ind J Pharm Sci*. 2006; 68(6): 705-14.
18. Shi R, Burt HM. Amphiphilic dextran-graft-poly(epsilon-caprolactone) films for the controlled release of paclitaxel. *Int J Pharm*. 2004; 271(1-2): 167-79.
19. Sun H, Guo B, Li X, Cheng R, Meng F, Liu H, et al. Shell-sheddable micelles based on dextran-SS-poly(epsilon-caprolactone) diblock copolymer for efficient intracellular release of doxorubicin. *Biomacromolecules*. 2010; 11(4): 848-54.
20. Fattahi A, Golozar MA, Varshosaz J, Mirmohammad Sadeghi H, Fathi MH. Preparation and characterization of micelles of oligomeric chitosan linked to all-trans retinoic acid. *Carbohydr Polym*. 2012; 87(2): 1176-1184.
21. Gabizon A, Horowitz AT, Goren D, Tzemach D, Shmeeda H, Zalipsky S. In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(17): 6551-9.
22. Park EK, Kim SY, Lee SB, Lee YM. Folate-conjugated methoxy poly (ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *J Control Release*. 2005; 109(1-3): 158-68.
23. Ross JF, Wang H, Behm FG, Mathew P, Wu M, Booth R, et al. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer*. 1999; 85(2): 348-57.
24. Zhao H, Yung LY. Selectivity of folate conjugated polymer micelles against different tumor cells. *Int J Pharm*. 2008; 349(1-2): 256- 68.
25. Liu J, Lee H, Allen C. Formulation of drugs in block copolymer micelles: drug loading and release. *Curr Pharm Des*. 2006; 12(36): 4685-701.

26. Nayebsadrian M, Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadegh H, Banitalebi M, Rostami M. Screening the most effective variables on physical properties of folate targeted dextran/retinoic acid micelles by Taguchi design. *J Nanomater.* 2012; 2012: 860691.
27. Khajavinia A, Varshosaz J, Dehkordi AJ. Targeting etoposide to acute myelogenous leukaemia cells using nanostructured lipid carriers coated with transferrin. *Nanotechnology.* 2012; 23(40): 405101.
28. Hu FQ, Wu XL, Du YZ, You J, Yuan H. Cellular uptake and cytotoxicity of shell crosslinked stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles encapsulating doxorubicin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 69(1): 117-25.
29. Cai S, Thati S, Bagby TR, Diab HM, Davies NM, Cohen MS, et al. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *J Control Release.* 2010; 146(2): 212-8.
30. Opanasopit P, Yokoyama M, Watanabe M, Kawano K, Maitani Y, Okano T. Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting. *Pharm Res.* 2004; 21(11): 2001-8.
31. Greish K, Fang J, Inutsuka T, Nagamitsu A, Maeda H. Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42(13): 1089-105.
32. Torchilin VP. Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(19-20): 2549-59.
33. Bocca C, Caputo O, Cavalli R, Gabriel L, Miglietha A, Gasco MR. Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 1998; 175(2): 185-93.
34. Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadeghi H, Ghelich Khan Z, Rostami M. Retinoic acid decorated albumin-chitosan nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin hydrochloride in hepatocellular carcinoma. *J Nanomater.* 2013; 2013: 254127.
35. Lee RJ, Low PS. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1995; 1233(2): 134-44.
36. You J, Li X, de Cui F, Du YZ, Yuan H, Hu FQ. Folate-conjugated polymer micelles for active targeting to cancer cells: preparation, in vitro evaluation of targeting ability and cytotoxicity. *Nanotechnology.* 2008; 19(4): 045102.
37. Hayama A, Yamamoto T, Yokoyama M, Kawano K, Hattori Y, Maitani Y. Polymeric micelles modified by folate-PEG-lipid for targeted drug delivery to cancer cells in vitro. *J Nanosci Nanotechnol.* 2008; 8(6): 3085-90.

Comparison of cytotoxic effect of β -cyclodextrin and dextran micelles loaded with doxorubicin in KG-1 cells

Banitalebi M¹, Varshosaz J^{2*}, Hassanzadeh F³, Sadeghi-Aliabadi H⁴, Nayebsadrian M¹

¹Student, Pharmaceutics Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran;

²Pharmaceutics Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; ³Pharmaceutical Chemistry Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran; ⁴ Biotechnology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 12/May/2013 Accepted: 6/Sep/2013

Background and aims: Anthracyclines are the main treatment for acute myeloid leukemia, but the use of them is limited by their side effects like cardiotoxicity. Using of polymeric micelles for targeted delivery of doxorubicin by folate receptors in acute myeloid leukemia can reduce these side effects. This study was aimed to compare the cytotoxic effect of β -cyclodextrin and dextran micelles loaded with doxorubicin in KG-1 cells.

Methods: In this laboratory experimental study, retinoic acid, cyclodextrin, folic acid, retinoic acid, dextran and folic acid conjugations were synthesized by esterification. Loading of drug in the micelles was done by direct dissolution method. Micellar nanoparticles which were optimized according to their size, zeta potential, loading efficiency and release efficiency of doxorubicin were selected and used to investigate the preventive effect of cell growing on KG-1 cells by MTT assay.

Results: The doxorubicin loaded in retinoic acid/ cyclodextrin/ folic acid micellar nanoparticles in the concentration of 0.377 μ g/ml (in KG-1 cells) were about 10.5 times more cytotoxic than free doxorubicin, 3.3 times more cytotoxic than doxorubicin loaded in retinoic acid/ cyclodextrin micelles and 8.3 times more cytotoxic than doxorubicin loaded in retinoic acid/ dextran/ folic acid micelles. The doxorubicin loaded in retinoic acid/ dextran/ folic acid micelles were about 1.3 times more cytotoxic than free doxorubicin and 1.2 times more cytotoxic than doxorubicin loaded in retinoic acid/ dextran micelles ($P < 0.05$).

Conclusion: Micellar nanoparticles of retinoic acid/ cyclodextrin/ folic acid loaded by doxorubicin could affect KG-1 cells more effective than free drug and retinoic acid/ dextran/ folic acid loaded by doxorubicin.

Keywords: Dextran, Cyclodextrin, Retinoic acid, Folic acid, doxorubicin, Micellar nanoparticles.

Cite this article as: Banitalebi M, Varshosaz J, Hassanzadeh F, Sadeghi-Aliabadi H, Nayebsadrian M. Comparison of cytotoxic effect of β -cyclodextrin and dextran micelles loaded with doxorubicin in KG-1 cells. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014 May, Jun; 16(2): 31-42.

*Corresponding author:

Pharmaceutics Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.
Tel:00983117922579, E-mail: varshosaz@pharm.mui.ac.ir